

**Polyester synthase gene and process for producing polyester**Patent Number:  EP0824148, A3, B1

Publication date: 1998-02-18

Inventor(s): TOSHIAKI FUKUI (JP); YOSHIHARU DOI (JP)

Applicant(s): RIKAGAKU KENKYUSHO (JP)

Requested Patent:  JP10108682

Application Number: EP19970113932 19970813

Priority Number(s): JP19960214509 19960814; JP19970199979 19970725

IPC Classification: C12N15/52; C12N15/60; C12N1/21; C12P7/62; C12N15/74; C12N1/21; C12R1/05

EC Classification: C12N9/00L, C12N9/88, C12P7/62A

Equivalents:  DE69728096D,  DE69728096T, JP3062459B2,  US5981257Cited Documents: WO9505472; WO9302187; WO9100917**Abstract**

The present invention relates to a polyester synthase gene coding for a polypeptide containing the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a sequence where in said amino acid sequence, one or more amino acids are deleted, replaced or added, said polypeptide bringing about polyester synthase activity; a gene expression cassette comprising the polyester synthase gene and either of open reading frames located upstream and downstream of said gene; a recombinant vector comprising the gene expression cassette; a transformant transformed with the recombinant vector; and a process for producing polyester by culturing the transformant in a medium and recovering polyester from the resulting culture.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

**BEST AVAILABLE COPY**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-108682

(43)公開日 平成10年(1998)4月28日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 N 15/09  
C 0 7 H 21/04  
C 1 2 N 1/21  
9/88  
C 1 2 P 7/62

識別記号  
ZNA

F I  
C 1 2 N 15/00  
C 0 7 H 21/04  
C 1 2 N 1/21  
9/88  
C 1 2 P 7/62

ZNAA

B

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 25 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平9-199979  
(22)出願日 平成9年(1997)7月25日  
(31)優先権主張番号 特願平8-214509  
(32)優先日 平8(1996)8月14日  
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000006792  
理化学研究所  
埼玉県和光市広沢2番1号  
(72)発明者 福居 俊昭  
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
内  
(72)発明者 土肥 義治  
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
内  
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 ポリエステル重合酵素遺伝子及びポリエステルの製造方法

(57)【要約】

【課題】 ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びポリエステルの製造方法の提供。

【解決手段】 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらすポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子、該ポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方とを含む遺伝子発現カセット、前記ポリエステル合成酵素遺伝子又は遺伝子発現カセットを含む組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された形質転換体、該形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらすポリベブチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子。

【請求項2】 配列番号1で表される塩基配列を含むポリエステル重合酵素遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2記載のポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方とを含む遺伝子発現カセット。

【請求項4】 ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項5】 ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号3で表される塩基配列を含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項6】 ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号6で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、エノイル-C<sub>6</sub>Aヒドラターゼ活性をもたらすポリベブチドをコードするDNAを含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項7】 ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号5で表される塩基配列を含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

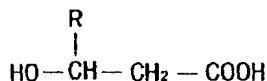
【請求項8】 請求項1若しくは2記載のポリエステル合成酵素遺伝子又は請求項3～7のいずれか1項に記載の遺伝子発現カセットを含む組換えベクター。

【請求項9】 請求項8記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項10】 請求項9記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【請求項11】 ポリエステルが、次式1：

【化1】



(Rは水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体である請求項10記載のポリエステルの製造方法。

【請求項12】 ポリエステルが、ポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体である請求項10記載のポリエステルの製造

## 方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及び該形質転換体を用いたポリエステルの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】数多くの微生物は、ポリ-3-ヒドロキシブチレート(P(3HB))を生合成し、エネルギーの貯蔵物質として体内に微粒子状で蓄えることが知られている。微生物体内から抽出したP(3HB)は、180°C程度に融解温度をもつ熱可塑性高分子であり、優れた生分解性と生体適合性を示すことから、環境を保全する“グリーン”プラスチックとして注目されている。また、P(3HB)は各種の微生物を用いて糖や植物油などの再生可能炭素資源から合成できる“グリーン”プラスチックである。しかしながら、P(3HB)は、高結晶性高分子のために耐衝撃性が劣るという物性上の問題があり、実用化が見送られてきた。

【0003】近年、3-ヒドロキシブチレート(3HB)と3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との2成分共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP(3HB-co-3HH)共重合体の製造法は、土より単離したアエロモナス・キャビエ(Aeromonas caviae)を用いてオレイン酸やオリーブオイルから発酵生産するものである。発酵生産したP(3HB-co-3HH)共重合体は、3HHユニット分率の増加とともに結晶化度が低下するために、柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れ、強い糸や透明でしなやかなフィルムにも加工できることが明らかにされている(Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, Macromolecules 28, 4822-4823 (1995))。しかしながら、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報に記載の製造方法では、ポリエステル収率(乾燥微生物体内のポリエステル含有量)が低いため、P(3HB-co-3HH)共重合ポリエステルを高収率で生産する方法の開発が望まれていた。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された形質転換体及び該形質転換体を用いたポリエステルの製造方法を提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ポリエステル重合酵素の遺伝子をクローニングし、さらにポリエステル重合酵素遺伝子に付随する上流及び下流のオープンリーディン

フレームのいずれか一方又は両方を欠失させることによりポリエステルを高収率で生産することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらすポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子である。該遺伝子としては、例えば配列番号1で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

【0007】さらに、本発明は、前記ポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方とを含む遺伝子発現カセットである。該遺伝子発現カセットにおいて、ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームとしては、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むもの（例えば配列番号3）が挙げられ、ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームとしては、配列番号6で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、エノイル-CoAヒドロターゼ活性をもたらすポリペプチドをコードするDNAを含むもの（例えば配列番号5）が挙げられる。

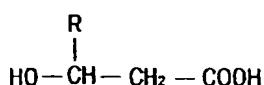
【0008】ここで、本発明のポリエステル重合酵素遺伝子は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じても、当該アミノ酸配列を有するポリペプチドがポリエステル重合活性を有する限り、そのポリペプチドをコードするDNAも本発明の遺伝子に含まれる。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列の第1番目のメチオニンが欠失したものをコードするDNAも、本発明の遺伝子に含まれる。

【0009】さらに、本発明は、前記ポリエステル重合酵素遺伝子又は前記遺伝子発現カセットを含む組換えベクターである。さらに、本発明は、前記組換えベクターによって形質転換された形質転換体である。

【0010】さらに、本発明は、前記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法である。ポリエステルとしては、例えば、次式1：

【0011】

【化2】



【0012】(Rは水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体（例えば、ポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体）が

挙げられる。以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】

(1) ポリエステル重合酵素遺伝子のクローニング

本発明のポリエステル重合酵素遺伝子は、アエロモナス属に属する微生物の菌体から分離される。まず、ポリエステル重合酵素遺伝子を有する菌株から染色体DNAを作製する。菌株としては、例えばアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) が挙げられる。

【0014】染色体DNAの調製は公知の方法を用いることができる。例えば、アエロモナス・キャビエをLB培地で培養した後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1卷; 2.4.3 頁, John Wiley & Sons 出版, 1994年) 等により染色体DNAを調製する。

【0015】上記の手法により得られたDNAを適当な制限酵素（例えばSau3A1, BamHI, BglII等）で部分分解した後、アルカリホスファターゼ処理を行い、DNA断片を脱リン酸化する。これを制限酵素（例えばBamHI, BglII等）で切断したベクターとライゲーションを行い、ライプラリーを作成する。

【0016】ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。ファージベクターとしては、例えばEMBL3, M13,  $\lambda$ gt11等が挙げられ、プラスミドベクターとしては、例えばpBR322, pUC18, pBluescript II (STRATAGENE社製) 等が挙げられる。さらに、大腸菌やバチルス・ブレビスなどの2種以上の宿主微生物で自律的増殖が可能なベクターのか、各種のシャトルベクターを使用することもできる。

30 3. このようなベクターについても、前記制限酵素で切断し、その断片を得ることができる。

【0017】DNA断片とベクター断片とを連結させるには、公知のDNAリガーゼを用いる。そして、DNA断片とベクター断片とをアニーリングさせた後連結させ、組換えベクターを作成する。

【0018】宿主微生物に組換えベクターを導入するには、公知の方法により行うことができる。例えば、宿主微生物が大腸菌の場合はカルシウム法 (Lederberg, E.M. et al., J. Bacteriol. 119, 1072 (1974)) やエレクトロボ

40 レーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1卷, 1.8.4 頁, 1994年) を採用することができる。宿主微生物がファージDNAの場合はインピトロ・パッケージング法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1卷, 5.7.1 頁, 1994年) 等を採用することができる。本発明では、インピトロ・パッケージング用キット (GigaPack II; STRATAGENE社製等) を用いることができる。

【0019】次に、アエロモナス・キャビエのポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得るためのプローブを調製する。ポリエステル重合酵素のアミノ酸配列

については、既に何種類かのものが知られている (Peoples, O.P. and Sinskey, A.J., *J.Biol.Chem.*, 264, 15293 (1989); Huisman, G.W. et al., *J.Biol.Chem.*, 266, 2191 (1991); Pieper, U. et al., *FEMS Microbiol.Lett.*, 96, 73 (1992) 他)。そこで、これらのアミノ酸配列のうち、保存されている 2 つの領域を選択し、それをコードする核酸塩基配列を推定してオリゴヌクレオチドを設計する。これらオリゴヌクレオチドとしては、例えば 5'-CC(C/G)CC(C/G)TCGATCAA(T/C)AACT(T/A)(T/C)TA(T/C)ATC-3' (配列番号 7)、及び 5'-(G/C)AGCCA(G/C)GC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GCCACCA-3' (配列番号 8) で表される 2 種類のオリゴヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0020】これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、アエロモナス・キャビエの染色体 DNA を錆型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Molecular Cloning, 2 卷, 14.2 頁, 1989 年) を行う。そして、PCR によりポリエステル重合酵素遺伝子を部分的に増幅する。

【0021】次に、この部分増幅断片を適当な試薬を用いて標識し、前記染色体 DNA ライブライマーからコロニーハイブリダイゼーションを行う (Current Protocols in Molecular Biology, 1 卷, 6.0.3 頁, 1994 年)。

【0022】コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングされた大腸菌からアルカリ法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1 卷, 1.6.1 頁, 1994 年) によってプラスミドを回収することにより、ポリエステル重合酵素遺伝子を含む DNA 断片が得られる。

【0023】上記 DNA 断片の塩基配列の決定は、公知方法、例えばサンガー法 (Molecular Cloning, 2 卷, 13.3 頁, 1989 年) 等によって行うことができ、塩基配列自動分析装置、例えば 373A · DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社) 等を用いて行うことができる。

【0024】配列番号 1 に本発明のポリエステル重合酵素遺伝子の塩基配列を、配列番号 2 に該遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を示すが、当該アミノ酸配列を有するポリペプチドがポリエステル重合活性をもたらす限り、アミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等の変異があつてもよい。また、本発明の遺伝子は、配列番号 2 で表されるアミノ酸をコードする塩基配列をもつもののほか、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものである。

【0025】なお、上記欠失等の変異は、公知の部位突然変異誘発方法 (Current Protocols in Molecular Biology 1 卷, 8.1.1 頁, 1994 年) により誘発することができる。上記手法により塩基配列が決定された後は、化学合成によって、又は染色体 DNA を錆型とした PCR 法によって、あるいは該塩基配列を有する DNA 断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

## 【0026】(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組み換えベクターを、該組み換えベクターを作製する際に用いた発現ベクターに適合する宿主中に導入することにより得られる。宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、アルカリゲネス属に属する微生物、ショードモナス属に属する微生物、バチルス属に属する微生物等の細菌、サッカロミセス属、カンジダ属等の酵母、COS 細胞、CHO 細胞等の動物細胞などが挙げられる。

【0027】アルカリゲネス属に属する微生物、ショードモナス属に属する微生物等の細菌を宿主として用いる場合は、本発明の組換え体 DNA が該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、本発明の DNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、広範囲の宿主において複製・保持される R K 2 複製起点を有する pLA2917 (ATCC 37355)、あるいは R S F 1010 複製起点を有する pJRD215 (ATCC 37533) 等が挙げられる。

【0028】プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trp プロモーター、lac プロモーター、P<sub>1</sub> プロモーター、P<sub>n</sub> プロモーター、T7 プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組み換え体 DNA の導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1 卷, 1.8.1 頁, 1994 年)、エレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1 卷, 1.8.4 頁, 1994 年) 等が挙げられる。

【0029】酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えば YEp13、YCP50 等が挙げられる。プロモーターとしては、例えば gal1 プロモーター、gal10 プロモーター等が挙げられる。酵母への組換え体 DNA の導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法 (Methods. Enzymol., 194, 182-187 (1990))、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

【0030】動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えば pcDNA1、pcDNA1/Amp (インビタジエン社) 等が用いられる。動物細胞への組換え体 DNA の導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法等が挙げられる。

【0031】ここで、前記のようにして決定された塩基配列は、ポリエステル重合酵素遺伝子のほかに、その上流及び下流にポリエステル合成に関与する遺伝子のオープンリーディングフレームが複数含まれている。すなわち、ポリエステル重合酵素遺伝子は、単一のプロモーター領域の支配下に少なくとも 2 個の ORF とともにオペロンを形成している。

【0032】ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に位置するORFを以下「ORF1」とい、下流に位置するORFを以下「ORF3」という。ORF1は、菌体内ポリエステルの蓄積に関与する遺伝子又はポリエステル生合成系遺伝子のものと思われる。また、ORF3は、ポリエステル生合成に関与するエノイル-CoAヒドロターゼ（特に（R）-特異的エノイル-CoAヒドロターゼ）をコードする遺伝子のものであることを明らかにした。

【0033】本発明では、図1に示すように、発現制御領域（図1(1)において「-35/-10」と表示）、ポリエステル重合酵素遺伝子、ORF1及びORF3を含むEcoRI断片をクローニングした（図1(1)）。この断片をEE32とする。

【0034】次に、EE32においてORF1又はORF3のいずれか一方又は両方を欠失させた断片（遺伝子発現カセット）を作製し、このカセットを宿主に導入することにより、ポリエステルを効率よく生産することができる形質転換体を得ることができる。

【0035】EE32中、発現制御領域とORF1の翻訳開始領域との間、及びORF1の翻訳停止領域とポリエステル重合酵素遺伝子の翻訳開始領域との間にそれぞれ制限酵素BglII部位を導入し、BglIIによりORF1を欠失させる（図1(2)）。これと同様にして、ポリエステル重合酵素遺伝子の翻訳停止領域とORF3との間に制限酵素BamHI領域を挿入し、BamHI処理によりORF3を欠失させる（図1(3)）。

【0036】ORF1及びORF3の両者を欠失させるには、EE32について、上記ORF1及びORF3を欠失させる操作を両方行えばよい（図1(4)）。なお、制限酵素部位は、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異法（Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 8.1.1頁, 1994年）によって導入することができる。

【0037】このようにして得られたそれぞれの遺伝子発現カセットを、前記発現可能なプラスミド（例えばpJRD215 (ATCC 37533)）に挿入し、得られた組換えベクターを用いて、アルカリゲネス・ユートロファス (Alcaligenes eutrophus)・PHB-4 株 (DSM541)（ポリエステル合成能欠損株）を形質転換する。形質転換法としては、例えば塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、低pH法、インピトロ・パッケージングによる方法、接合伝達法等が挙げられる。

#### 【0038】(3) ポリエステルの製造

ポリエステルの製造は、本発明の形質転換体を培地で培養し、培養菌体又は培養物中に本発明のポリエステルを生成蓄積させ、該培養菌体又は培養物から該ポリエステルを採取することにより行われる。本発明の形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0039】アルカリゲネス属に属する微生物又はショードモナス属に属する微生物等の細菌を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源を与え、窒素源、無機塩類及び有機栄養源のうちのいずれかを制限した培地、例えば窒素源を0.01～0.1%に制限した培地が挙げられる。

【0040】炭素源は微生物の増殖に必要であり、かつ、ポリエステル合成の原料となるものであり、その例としては、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、マルトース等の炭水化物が挙げられる。また、炭素数2以上の油脂関連物質を炭素源とすることもできる。

炭素数2以上の油脂関連物質としては、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、バーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油又は牛油などの天然油脂、酢酸、プロピオン酸、ブタノ酸、ベントン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、バルミチニ酸、リノレン酸、リノール酸若しくはミリスチン酸等の脂肪酸又はこれら脂肪酸のエステル、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール若しくはバルミチルアルコール等又はこれらアルコールのエステル等が挙げられる。

【0041】窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカー等が挙げられる。無機物としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0042】培養は、通常振盪培養などの好気的条件30下、25～37°Cで発現誘導後24時間以上（例えば1～7日）行う。培養中は、カナマイシン、アンビシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。そして、培養することによりポリエステルを菌体内に蓄積させ、その後、このポリエステルを回収する。

【0043】誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)、インドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加することができる。

【0044】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えばRPMI-1640、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、30～37°Cで14～28日間行う。培養中はカナマイシン、ベニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

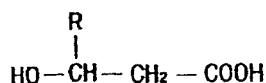
【0045】本発明において、ポリエステルの精製は例えば以下のように行うことができる。培養液から遠心分離によって形質転換体を集め、蒸留水で洗浄した後、乾燥させる。その後、クロロホルムに乾燥形質転換体を懸

濁し、加熱することによってポリエステルを抽出する。なお、濾過によって残渣を取り除く。このクロロホルム溶液にメタノールを加えてポリエステルを沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去した後、乾燥して精製ポリエステルを得る。

【0046】得られたポリエステルが目的のものであることの確認は、通常の方法、例えばガスクロマトグラフ法、核磁気共鳴法等により行う。本発明の遺伝子はアエロモナス・キャビエから単離したポリエステル重合酵素をコードする遺伝子を含んでいる。この重合酵素は、次 10 式 I :

【0047】

【化3】



【0048】(Rは水素原子又は炭素数1~4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとした共重合体(ポリエステル)を合成することが可能である。上記共重合体としては、例えばポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HH))等が挙げられ、前記重合酵素遺伝子を導入した形質転換体はP(3HB-co-3HH)を極めて高効率で生産する能力を示す。

【0049】従来では、ポリ-3-ヒドロキシブチレート(P(3HB))あるいはポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HV))の製造法について研究、開発がなされきたが、これらのポリエステルは高結晶性高分子のために耐衝撃性が劣るという物性上の問題がある。

【0050】炭素数6の3-ヒドロキシヘキサノエートをポリマー鎖に導入することによって結晶化度が低下するため、ポリエステルは柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れるが、アエロモナス・キャビエを用いた従来のP(3HB-co-3HH)製造法(特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報)では、ポリエステルの収率が低い。

【0051】これに対し、本発明ではP(3HB-co-3HH)共重合ポリエステルを高収率で生産することができる。上記手法により目的とするポリエステルを大量に得ることができるため、これを用いて生分解性の糸やフィルム、各種容器等の素材として利用することができる。また、本発明の遺伝子を用いてP(3HB-co-3HH)共重合ポリエステル高生産株を育種することもできる。

【0052】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

【実施例1】アエロモナス・キャビエのポリエステル重

#### 合酵素遺伝子のクローニング

最初に、アエロモナス・キャビエの染色体DNAライブラリーを作製した。

【0053】アエロモナス・キャビエFA440株を10mlのLB培地(1%イーストエキス、0.5%トリプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%グルコース、pH7.5)中、30°Cで終夜培養した後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム法(Currnt Protocols in Molecular Biology,1巻, 2.4.3.頁, 1994年; John Wiley & Sons出版)により染色体DNAを得た。

【0054】得られた染色体DNAを制限酵素Sau3AIで部分分解した。またベクターブラスミドについては、コスミドベクターであるpLA2917(ATCC37355)を使用した。このプラスミドを制限酵素BglIIで切断し、脱リン酸化処理(Molecular Cloning,1巻, 5.7.2.頁, 1989年; Cold Spring Harbar Laboratory出版)を施した後、DNAリガーゼを用いて染色体DNA部分分解断片と連結させた。

【0055】この連結DNA断片を用いたインピトロ・パッケージング法(Currnt Protocols in Molecular Biology,1巻, 5.7.2.頁, 1994年)によって大腸菌S17-1株を形質転換し、アエロモナス・キャビエ染色体DNAライブラリーを得た。

【0056】次に、アエロモナス・キャビエのポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得るためのプローブを調製した。これまでに知られている数種のポリエステル重合酵素のアミノ酸配列でよく保存されている2つの領域を選択し、それをコードする核酸塩基配列を推定して5'-CC(C/G)CC(C/G)TGGATCAA(T/C)AACT(T/A)(T/C)TA(T/C)ATC-3'(配列番号7)、及び5'-(G/C)AGCCA(G/C)CC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GGCCACCA-3'(配列番号8)で表される2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0057】これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、アエロモナス・キャビエの染色体DNAを鑄型としたPCR法によってポリエステル重合酵素遺伝子を部分增幅した。PCRは、94°Cで30秒、50°Cで30秒及び72°Cで60秒の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。この部分增幅断片をDIG DNA標識キット(ペーリンガーマンハイム社製)によってジゴキシゲニン標識し、プローブとした。

【0058】得られたプローブを用いてアエロモナス・キャビエ染色体DNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法によってポリエステル重合酵素遺伝子を含むプラスミドを有する大腸菌を単離した。この大腸菌からアルカリ法によってプラスミドを回収することでポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得た。この断片のBglII-EcoRI断片についてサンガーフ法によって塩基配列を決定した。その結果、配列番号9又は50 10で表される3.2kb断片の塩基配列が決定された。

【0059】さらに、この塩基配列について相同性検索を行った結果、この3.2kbpの塩基配列の中には、配列番号1で表される塩基配列(1785bp)を含むポリエステル重合酵素遺伝子を同定することができた。なお、本発明においては、本発明のポリエステル重合酵素遺伝子によりコードされるタンパク質が、ポリエステル重合の遺伝子発現機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。

【0060】また、配列番号9又は10で表される塩基配列を有する断片において、上記1785bpの塩基配列の下流に存在する405bpの遺伝子(ORF3)及び転写終結領域、並びに上流に存在する354bpの遺伝子(ORF1)及び発現調節領域を同定した。ORF1の塩基配列を配列番号3、ORF1によりコードされるアミノ酸配列を配列番号4に、ORF3の塩基配列を配列番号5、ORF3によりコードされるアミノ酸配列を配列番号6に示す。ここで、ORF3はポリエステル生合成に関与するエノイル-CoAヒドラターゼをコードする遺伝子のものである。そして、ORF3によりコードされるアミノ酸を有するポリベプチドがエノイル-CoAヒドラターゼ活性、特に(R)-特異的エノイル-CoAヒドラターゼ活性をもたらす限り、当該アミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。また、配列番号9及び10で表される塩基配列において、発現調節領域は第1～383番目であり、転写終結領域は第3010～3187番目である。

【0061】〔実施例2〕アルカリゲネス・ユートロファス形質転換体の作製

実施例1で同定された発現調節領域、ORF1、ポリエステル重合酵素遺伝子、ORF3及び転写終結領域を含むBglII-EcoRI断片のBglII部位をEcoRIリンカーを用いてEcoRI部位とし、3.2kbpのEcoRI-EcoRI断片(EE32断片)を得た。これをアルカリゲネス属に属する微生物中で発現可能なプラスミドpJRD215(ATCC37533)に挿入し、得られた組換えプラスミドでアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株(DSM541)(ポリエステル合成能欠損株)を接合伝達法によって形質転換した。

【0062】すなわち、まず、この組換えプラスミドを用いて大腸菌S17-1株を塩化カルシウム法によって形質転換した。この組換え大腸菌とアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株をLB培地1.5ml中、30°Cで終夜培養し、それぞれの培養液0.1mlを混合し、30°Cで4時間培養した。この菌体混合液をMBF寒天培地(0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム、0.5%フルクトース、1.5%寒天、0.3mg/mlカナマイシン)に塗布し、30°Cで5日間培養した。

【0063】組換え大腸菌中のプラスミドがアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株に伝達されるとカナマイシン耐性を示すことから、MBF寒天培地上で増殖したコロニーはアルカリゲネス・ユートロファス形質転換体

である。この中から1個のコロニーを単離し、アルカリゲネス・ユートロファスAC32株(以下、AC32株と呼ぶ)を得た。なお、AC32株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-15786として寄託されている。

【0064】さらに合成オリゴスクレオチドを用いた部位特異的変異法(Currnt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 8.1.1頁, 1994年)によってEE32断片中のORF1遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BglII部位を導入し、BglII-BglII断片を欠失させることによってORF1遺伝子が欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC321株と呼ぶ。

【0065】同様に、部位特異的変異法によってEE32断片中のORF3遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BamHI部位を導入し、BamHI-BamHI断片を欠失させることによってORF3遺伝子が欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC323株と呼ぶ。

【0066】同様に、EE32断片中のORF1遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BglII部位を、ORF3遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BamHI部位を導入し、BglII-BglII断片およびBamHI-BamHI断片を欠失させることによってORF1遺伝子およびORF3遺伝子が共に欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC3213株と呼ぶ。

【0067】さらに、EE32断片を鋳型とし、PCR法によってポリエステル重合酵素遺伝子を増幅し、得られた増幅断片を、公知であるアルカリゲネス・ユートロファス由来ポリエステル合成系遺伝子の発現調節領域と転写終結領域との間に挿入した。PCRは、5'-AGTTCCC  
CCCTCCGGTGTGGGTCAA-3'(配列番号11)および5'-GGCATAT  
CCGCTCATCCCCCTCCT-3'(配列番号12)をプライマーとして、94°Cで30秒、55°Cで30秒及び72°Cで60秒の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。

【0068】このDNA断片をプラスミドpJRD215に挿入し、得られた組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC29株と呼ぶ。

【0069】〔実施例3〕アルカリゲネス・ユートロファス形質転換体によるポリエステル合成  
50 アルカリゲネス・ユートロファスH16株、PHB-4

株、AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株、AC29株を、それぞれ、95mlのMB培地(0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム)に1mlの1%オクタン酸ナトリウムを加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30°Cで培養した。AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株及びAC29株についてはカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。12時間、24時間、36時間及び48時間経過後にそれぞれ1mlの1%オクタン酸ナトリウムを添加しつつ(オクタン酸ナトリウムの総添加量0.5g)、72時間培養した。

【0070】H16株、及びAC3213株については上述のMB培地に1%オリーブ油、バーム油、コーン油、あるいはオレイン酸を加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30°Cで72時間培養した。なお、AC3213株を培養する際には、培地にカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。

【0071】H16株、AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株については上述のMB培地に1mlの1%ヘプタン酸ナトリウムを加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30°Cで培養した。なお、AC3213株、AC321株、AC323株、及びAC3213株\*

\*を培養する際には、培地にカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。12時間、24時間、36時間及び48時間経過後にそれぞれ1mlの1%ヘプタン酸ナトリウムを添加しつつ(ヘプタン酸ナトリウムの総添加量0.5g)、72時間培養した。

【0072】培養後、遠心分離によって菌体を回収し、蒸留水で洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。乾燥菌体10~30mgに2mlの硫酸-メタノール混液(15:85)と2mlのクロロホルムを添加して密栓し、100°Cで140分間加熱することにより、菌体内ポリエステル分解物のメチルエステルを得た。これに1mlの蒸留水を添加して激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機層を取り出し、その組成をキャビラリーガスクロマトグラフィーによって分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所製GC-14A、キャビラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1(カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4μm)を用いた。温度条件は、初発温度100°Cから8°C/分の速度で昇温した。得られた結果を表1、表2、および表3に示す。

【0073】

【表1】

表1 オクタン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	乾燥菌体重量 (g/1)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成 3HB 3HH (モル%)	
H16	3.00	86	100	0
PHB-4	0.80	0	~	~
AC32	0.99	33	78	23
AC321	2.85	92	87	13
AC323	2.85	92	88	12
AC3213	3.64	96	85	15
AC29	3.20	94	92	8

3HB: 3-ヒドロキシブチレート、3HH: 3-ヒドロキシヘキサノエート

【0074】

※※【表2】

表2 植物油またはオレイン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	炭素源	乾燥菌体重量 (g/1)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成 3HB 3HH (モル%)	
H16	オリーブ油	4.27	79	100	0
	コーン油	3.57	81	100	0
	バーム油	4.13	79	100	0
	オレイン酸	4.06	82	100	0
AC3213	オリーブ油	3.54	76	96	4
	コーン油	3.60	77	95	5
	バーム油	3.58	81	96	4
	オレイン酸	2.22	70	96	4

3HB: 3-ヒドロキシブチレート、3HH: 3-ヒドロキシヘキサノエート

【0075】

【表3】

表3 ヘプタン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	乾燥菌体重量 (g/1)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成 3HB 3HV 3HHP (モル%)		
			3HB	3HV	3HHP
H16	2.50	60	50	50	0
AC32	0.77	7	30	67	5
AC321	1.67	55	46	52	2
AC323	1.27	40	48	45	7
AC3213	2.76	67	44	48	8

3HB : 3-ヒドロキシブチレート、3HV : 3-ヒドロキシバリレート

3HHP : 3-ヒドロキシヘプタノエート

【0076】オクタン酸を炭素源とした場合、表1に示すようにアルカリゲネス・ユートロファス野生株であるH16株ではポリ(3-ヒドロキシブチレート)ホモポリマーを合成する。これはH16株の有するポリエステル重合酵素は炭素数6の3HH(3-ヒドロキシヘキサノエート)を基質としないためである。そのポリエステル合成能欠損株であるPHB-4株では変異処理によってポリエステル重合酵素が欠損しているため、ポリエステルを蓄積しない。PHB-4株にアエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素遺伝子を含むEE32断片を導入したAC32株では3HH(3-ヒドロキシヘキサノエート)分率22モル%のポリ(3-ヒドロキシブチレート-3ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HH))を乾燥菌体重量あたり33重量%蓄積した。

【0077】さらに、AC321株、AC323株、AC3213株では3HH分率12~15モル%のP(3HB-co-3HH)を92~96重量%蓄積し、ORF1遺伝子、ORF3遺伝子、あるいはその両方を欠失させることでポリエステル収率が著しく改善された。

【0078】また、導入したポリエステル重合酵素遺伝子の発現調節領域および転写終結領域をアルカリゲネス・ユートロファス由来のものに置換したAC29株でも、94重量%のP(3HB-co-3HH)を蓄積し、由来の異なる発現調節領域および転写終結領域を使用してもポリエステル収率が著しく改善された。

【0079】最もポリエステル収率の高いAC3213株をオリーブ油、コーン油、バーム油を炭素源として培養したところ、表2に示すように3HH分率4~5モル%のP(3HB-co-3HH)を76~81重量%蓄積した。植物油に最も多く含まれる脂肪酸成分であるオレイン酸を炭素源としても3HH分率4モル%のP(3HB-co-3HH)を70重量%で蓄積した。野性株であるH16株はこの条件下でポリ(3-ヒドロキシブチレート)ホモポリマーのみを合成した。

【0080】なお、アエロモナス・キャビエFA440株では、バルミチン酸を炭素源として8重量%のP(3HB-co-3HH)を蓄積することが報告されている(特開平7-265065号公報)。本発明においてはオクタン酸を炭素源として96重量%のP(3HB-co-3HH)が、また極めて安価である植物油を炭素源として76~81重量%のP(3HB-

c-3HH)が蓄積されることから、公報記載の方法と比較すると、本実施例で使用した形質転換体によるP(3HB-co-3HH)合成法は極めて優れた方法であると言える。

【0081】ヘプタン酸を炭素源とした場合、表2に示すようにアルカリゲネス・ユートロファス野生株であるH16株ではポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート)共重合体(P(3HB-co-3HV))を合成する。これはH16株の有するポリエステル重合酵素は炭素数7の3HHP(3-ヒドロキシヘプタノエート)を基質としないためである。PHB-4株にアエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素遺伝子を含むEE32断片を導入したAC32株では3HHP分率5モル%のポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート-3-ヒドロキシヘプタノエート)三元共重合体(P(3HB-co-3HV-co-3HHP))を乾燥菌体重量あたり7重量%蓄積した。

【0082】さらに、AC321株、AC323株、AC3213株では3HHP分率2~8モル%のP(3HB-co-3HV-co-3HHP)を40~67重量%蓄積し、ORF1遺伝

30 遗伝子、ORF3遺伝子、あるいはその両方を欠失させることでポリエステル収率が著しく改善された(表3)。

【0083】これらの結果から、アエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素は炭素数4~7の3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする共重合ポリエステルを合成することができると言える。

【0084】(実施例4) ORF3の機能同定  
EE32断片を鋳型として、PCR法によってORF3遺伝子を增幅し、発現プラスミドPET-3a(ノバジエン社製)のT7プロモーター下流に挿入した。PCRは40 5'-CCCATATCAGGGCACAATCCCTGGAACTAG-3'(配列番号13)および5'-CTGGATCCGGGCTTAAGGCCACCTTG-3'(配列番号14)をプライマーとして、95°Cで60秒、68°Cで30秒の反応を1サイクルとして25サイクル行った。得られたプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)株(ノバジエン社製)を形質転換した。得られた形質転換体を以下、NB3株とする。

【0085】NB3株を100mlのLB培地で30°C、4時間培養し、インプロビルチオガラクトビラノシド(IPTG)を最終濃度0.4mMとなるように添加して発現を誘導し、さらに30°Cで2時間培養した。菌体を遠心分離によ

って回収した後、超音波破碎、遠心分離によって可溶性タンパク画分を得た。表4に示すように、発現プラスミドを導入した菌体の可溶性画分には高いエノイル-C<sub>o</sub>A活性

表4 可溶性タンパク画分のエノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼ比活性  
(ユニット/mgタンパク)

大腸菌BL21(DE3) 株/PET-3a	0
大腸菌NB3 株	1700

【0087】エノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼ活性はクロトニル-C<sub>o</sub>A(シグマ社製)を基質とし(濃度0.25mM)、2重結合の水和に伴う吸光度変化(263nm)を測定することにより求めた。一方、ORF3遺伝子を挿入していないコントロールプラスミドPET-3aを導入した大腸菌株では活性はまったく検出されなかった。

【0088】そこで、エノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼタンパクの精製を行った。NB3株の可溶性タンパク画分をQ-セファロース陰イオン交換カラム(ファルマシア)※

表5 エノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼ比活性  
(ユニット/mgタンパク)

大腸菌NB3株可溶性タンパク画分 陰イオン交換カラム溶出画分	1700 5100
-----------------------------------	--------------

【0090】得られた精製エノイル-C<sub>o</sub>AヒドラターゼタンパクのN末端アミノ酸配列を決定したところ、表6に示すように開始コドンであるMet以外のアミノ酸配列は、ORF3遺伝子の塩基配列から推定したアミノ酸★

表6 アミノ酸配列の比較

精製エノイル-C <sub>o</sub> Aヒドラターゼ N-末端アミノ酸配列: ORF3塩基配列から の推定アミノ酸配列:	SAQSLEVGQKARLSKRPQAA (配列番号15) MSAQSLLEVQKARLSKRPQAA (配列番号16)
--	---

【0092】このことから、ORF3がエノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼをコードしていることが確認できた。Metは翻訳後修飾によって脱離したものと考えられる。また、ORF3にコードされるエノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼの立体特異性について以下のように検討した。

【0093】活性測定の反応溶液に(S)-3-ヒドロキシブチリル-C<sub>o</sub>Aデヒドロゲナーゼ(シグマ社製)(最終濃度0.2ユニット/ml)と酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD<sup>+</sup>)(最終濃度0.5mM)を添加すると、エノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼの特異性が(S)-体特異的であれば、生成した(S)-3-ヒドロキシブチリル-C<sub>o</sub>Aはデヒドロゲナーゼの作用によってアセトアセチル-C<sub>o</sub>Aに酸化される。それ★

30☆に伴ってNAD<sup>+</sup>は還元されてNADHが生成し、340nmに特異的な吸収を生じる。逆にエノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼが(R)-体特異的であれば、NADHは生成しない。

【0094】表7に示すように、ORF3にコードされるエノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼを用いた場合では、340nmの吸光度変化はエノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼ無添加の場合とほとんど同じであったが、市販の(S)-特異的エノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼ(シグマ社製)を用いた場合では、NADHの生成に伴う吸光度変化が見られた。

表7 1分後の340nmにおける吸光度変化

エノイル-C <sub>o</sub> Aヒドラターゼ無添加 ORF3由来エノイル-C <sub>o</sub> Aヒドラターゼ (S)-体特異的エノイル-C <sub>o</sub> Aヒドラターゼ (シグマ社製)	0.045 0.047 0.146
---	-------------------------

【0096】この結果から、精製エノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼは(R)-体特異的であることが明らかとなっ

た。従って、ORF3は(R)-体特異的エノイル-C<sub>o</sub>Aヒドラターゼをコードしていることが分かった。

【0097】

【発明の効果】本発明により、ポリエステル重合酵素遺

伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びポリエステルの製造方法が提供される。本発明の遺伝子は、炭素数4～7の3-ヒドロキシアルカン酸をモノマユニットとする共重合ポリエステルを合成することが可能なポリエステル重合酵素をコードしている点で、また、本発明の製造方法は、熱安定性や成形性に優れた生分解性プラスチックであるP(3HB-co-3H)を効率よく合成可能である点で有用である。\*

\*【0098】  
【配列表】  
配列番号：1  
配列の長さ：1785  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：genomic DNA

## 配列：

ATG ACC CAA CCA TCT TAT CCC CCG CTG TTC CAG CCC CTG CCC CAC TAC	48
Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr	
1 5 10 15	
AAT GAC AAG CTG CTG CCC ATG GCC AAG GCC CAG ACA GAG CCC ACC CCC	96
Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala	
20 25 30	
CAG GCG CTG CTG CAG ACC AAT CTG GAC GAT CTG GCC CAG GTG CTG CAG	144
Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu	
35 40 45	
CAG GCC AGC CAG CAA CCC TCG CAG CTG ATC CAG CCC CAG ATG AAC TGG	192
Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp	
50 55 60	
TGG CAG GAT CAG CTC AAG CTG ATG CAG CAC ACC CTG CTC AAA ACC CCA	240
Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala	
65 70 75 80	
GCC CAG CCG ACC GAG CCG GTG ATC ACC CCG CAG CCC ACC GAT CCC CGC	288
Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg	
85 90 95	
TTC AAG GCC GAG GCC TCG ACC GAA CAA CCC ATC TAT GAC TAC CTC AAG	336
Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys	
100 105 110	
CAG TCC TAC CTG CTC ACC GCC ACG CAC CTG CTG CCC TCG GTG GAT CCC	384
Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala	
115 120 125	
CTG GAG CGC GTC CCC CAG AAG ACC CGG GAG CGG CTG CGT TIC TTC ACC	432
Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr	
130 135 140	
CGC CAG TAC GTC AAC CCC ATG GCC CCC AGC AAC TTC CTG GCC ACC AAC	480
Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn	
145 150 155 160	
CCC CAG CTG CTC AAG CTG ACC CTG GAG TCC GAC CCC CAG AAC CTG GTG	528
Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val	
165 170 175	
CGC CGA CTG GCC CTC TTG GCC GAG GAT CTG GAG CCC ACC GCC GAT CAG	576
Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln	
180 185 190	
CTC AAC ATC CCC CTG ACC GAC GAA TCC CCC TTC GAG CTC CCG CCG GAT	624
Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp	
195 200 205	
CTG CCC CTG ACC CCG CCC CGG GTG GTG CAG CCC ACC GAG CTC TAT GAG	672
Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu	

21

22

210	215	220	
CTC ATT CAG TAC AGC CCG ACT ACC GAG ACG GTG CCC AAG ACA CCT GTG			720
Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val			
225	230	235	240
CTG ATA GTG CCG CCC TTC ATC AAC AAG TAC TAC ATC ATG GAC ATG CCG			768
Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg			
245	250	255	
CCC CAG AAC TCC CTG GTC GCC TGG CTG GTC CCC CAG GCC CAG ACG GTA			816
Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gln Thr Val			
260	265	270	
TTC ATG ATC TCC TGG CCC AAC CCG CCC GTG CCC CAG GCC CAA ATC GAT			864
Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp			
275	280	285	
CTC GAC GAC TAC GTG GTG CAT GCC GTC ATC CCC CCC CTG GAC CCC GTG			912
Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val			
290	295	300	
GAG GCG GCC ACC GGC GAG CCG GAG GTG CAC CCC ATC GGC TAC TGC ATC			960
Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile			
305	310	315	320
GGC GGC ACC GCC CTG TCG CTC GCC ATG GCG TGG CTG GCG GCG CCC			1008
Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg			
325	330	335	
CAG AAG CAG CGG GTG CGC ACC GCC ACC CTG TTC ACT ACC CTG CTG GAC			1056
Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp			
340	345	350	
TTC TCC CAG CCC GGG GAG CTT GCC ATC TTC ATC CAC GAG CCC ATC ATA			1104
Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile			
355	360	365	
CCG GCG CTC GAG GCG CAA AAT GAG CCC AAG GCG ATC ATG GAC GCG CCC			1152
Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg			
370	375	380	
CAG CTG CGG GTC TCC TTC ACC CTG CTG CGG GAG AAC ACC CTC TAC TCG			1200
Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp			
385	390	395	400
AAC TAC TAC ATC GAC ACC TAC CTC AAG CGT CAG ACC CCG GTG CCC TTC			1248
Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe			
405	410	415	
GAT CTG CTG CAC TGG AAC ACC GAC ACC AAT GTG GCG GGC AAG ACC			1296
Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr			
420	425	430	
CAC AAC AGC CTG CTG CGC CGT CTC TAC CTG GAG AAC CAG CTG GTG AAG			1344
His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys			
435	440	445	
GGG GAG CTC AAG ATC CGC AAC ACC CCC ATC GAT CTC CCC AAG GTG AAG			1392
Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys			
450	455	460	
ACC CCT GTG CTG CTG GTG TCG CGG GTG GAC GAT CAC ATC CCC CTC TGG			1440
Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp			
465	470	475	480
CAG GCG ACC TGG CAG CGC ATG AAG CTG TTT CGC CGG GAG CAG CCC TTC			1488

Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe  
 485 490 495  
 CTC CTG CCG GAG TCC CCC CAC ATC CCC CCC ATC ATC AAC CCG CCG CCC 1536  
 Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala  
 500 505 510  
 CCC AAC AAG TAC CCC TTC TCG CAC AAC CGG CCC GAG CCC GAG ACC CCG 1584  
 Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro  
 515 520 525  
 CAG ACC TCG CTG CCA CGG CGG ACG CAC CAG CCC TCC TCG TCG CCC 1632  
 Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro  
 530 535 540  
 GAG ATG ATG GCC TTT ATC CAG AAC CGT GAC GAA CGG TCA GAG CCC GTC 1680  
 Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val  
 545 550 555 560  
 CCC CGG CGG GTC CCG GAG GAA CGG CTG CCC CCC CCC CCC CAC TAT 1728  
 Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr  
 565 570 575  
 GTC AAG GTG CGG CTC AAC CCC GTG TTT GCC TCC CCA ACA GAG GAG GAC 1776  
 Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp  
 580 • 585 590  
 CCC GCA TGA 1785  
 Ala Ala

[0099] 配列番号: 2

\* トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 594

配列の種類: タンパク質

配列の型: アミノ酸

\*

配列:

Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr  
 1 5 10 15  
 Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala  
 20 25 30  
 Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu  
 35 40 45  
 Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp  
 50 55 60  
 Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg  
 85 90 95  
 Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys  
 100 105 110  
 Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala  
 115 120 125  
 Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr  
 130 135 140  
 Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val  
 165 170 175  
 Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln  
 180 185 190

25

26

Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp  
 195 200 205  
 Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu  
 210 215 220  
 Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val  
 225 230 235 240  
 Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg  
 245 250 255  
 Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gly Gln Thr Val  
 260 265 270  
 Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp  
 275 280 285  
 Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val  
 290 295 300  
 Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg  
 325 330 335  
 Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp  
 340 345 350  
 Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile  
 355 360 365  
 Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg  
 370 375 380  
 Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp  
 385 390 395 400  
 Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe  
 405 410 415  
 Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr  
 420 425 430  
 His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys  
 435 440 445  
 Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys  
 450 455 460  
 Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp  
 465 470 475 480  
 Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe  
 485 490 495  
 Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala  
 500 505 510  
 Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro  
 515 520 525  
 Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro  
 530 535 540  
 Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val  
 545 550 555 560  
 Pro Ala Arg Val Pro Gln Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr  
 565 570 575  
 Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp  
 580 585 590

Ala Ala

[0100] 配列番号：3

配列の長さ：354

配列の型：核酸

\* 鎮の数：二本鎮

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：genomic DNA

配列：

ATG ATG AAT ATG GAC GTC ATC AAG ACC TTT ACC GAG CAG ATG CAA CCC	48
Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly	
1 5 10 15	
TTC GCC CCC CTC ACC CCC TAC AAC CAG CTG CTG CCC ACC AAC ATC	96
Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn	
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile	
20 25	
GAA CAG CTG ACC CGG TTG CAG CTG GCC	30
TCC GCC AAC GCC TAC GCC GAA	144
Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala	
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu	
35 40	
CTG GGC CTC AAC CAG TTG CAG GCC GTG	45
AGC AAG GTG CAG GAC ACC CAG	192
Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val	
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln	
50 55	
AGC CTG GCG GCC CTG GGC ACA GTG CAA	60
CTG GAG ACC GCC AGC CAG CTC	240
Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln	
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu	
65 70	
TCC CGC CAG ATG CTG GAT GAC ATC CAG	75 80
AAG CTG AGC GCC CTC GGC CAG	288
Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln	
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln	
85	
CAG TTC AAG GAA GAG CTG GAT GTC CTG	90 95
ACC GCA GAC GGC ATC AAG AAA	336
Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu	
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys	
100 105	
AGC ACG GGC AAG GCC TGA	110
Ser Thr Gly Lys Ala	354
115	

[0101] 配列番号：4

配列の長さ：117

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Met	Met	Asn	Met	Asp	Val	Ile	Lys	Ser
Phe	Thr	Gl u	Gln	Met	Gln	Gly		
1				5				
10					15			
Phe	Ala	Ala	Pro	Leu	Thr	Arg	Tyr	Asn
Gln	Leu	Leu	Ala	Ser	Asn	Ile		
			20					25
				30				
Glu	Gln	Leu	Thr	Arg	Leu	Gln	Leu	Ala
Ser	Ala	Asn	Ala	Tyr	Ala	Glu		
	35						40	
			45					
Leu	Gly	Leu	Asn	Gln	Leu	Gln	Ala	Val
Ser	Lys	Val	Gln	Asp	Thr	Gln		
	50					55		
		60						
Ser	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Val	Gln
Leu	Glu	Thr	Ala	Ser	Gln	Leu		
	65				70			
			75				80	
Ser	Arg	Gln	Met	Leu	Asp	Asp	Ile	Gln
Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	Gln		
			85					
	90				95			
Gln	Phe	Lys	Gl u	Gl u	Leu	Asp	Val	Leu
Thr	Ala	Asp	Gly	Ile	Lys	Lys		
			100					105
				110				
Ser	Thr	Gly	Lys	Ala				
		115						

〔0102〕配列番号：5

\*鎖の数：二本鎖

配列の長さ : 405

### トポロジー：直鎖状

### 配列の型：核酸

\* 配列の種類: genomic DNA

## 配列

ATG	AGC	GCA	CAA	TCC	CTG	GAA	GTA	GGC
CAG	AAG	GCC	CGT	CTC	AGC	AAG		48
Met	Ser	Ala	Gln	Ser	Leu	Glu	Val	Gly
Gln	Lys	Ala	Arg	Leu	Ser	Lys		
					5			
							15	
1								
10								
CGG	TTC	GGG	GCG	GCG	GAG	GTA	GCC	GCC
TTC	GCC	GCG	CTC	TCG	GAG	GAC		96
Arg	Phe	Gly	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Ala
Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Asp		
					20			25
						30		
TTC	AAC	CCC	CTG	CAC	CTG	GAC	CCG	GCC
TTC	GCC	GCC	ACC	ACG	GCG	TTC		144
Phe	Asn	Pro	Leu	His	Leu	Asp	Pro	Ala

31

32

Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Phe	
			35				40
				45			
GAG	CGG	CCC	ATA	GTC	CAC	GGC	ATG CTG
CTC	GCC	AGC	CTC	TTC	TCC	GGG	192
Glu	Arg	Pro	Ile	Val	His	Gly	Met Leu
Leu	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Gly	
			50				55
				60			
CTG	CTG	GGC	CAG	CAG	TTG	CCG	GGC AAG
GGG	AGC	ATC	TAT	CTG	GGT	CAA	240
Leu	Leu	Gly	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly Lys
Gly	Ser	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gln	
		65			70		
			75			80	
AGC	CTC	AGC	TTC	AAG	CTG	CCG	GTC TTT
GTC	GGG	GAC	GAG	GTG	ACG	GCC	288
Ser	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Pro	Val Phe
Val	Gly	Asp	Glu	Val	Thr	Ala	
			85				
		90			95		
GAG	GTG	GAG	GTG	ACC	GCC	CTT	CGC GAG
GAC	AAG	CCC	ATC	GCC	ACC	CTG	336
Glu	Val	Glu	Val	Thr	Ala	Leu	Arg Glu
Asp	Lys	Pro	Ile	Ala	Thr	Leu	
			100				105
				110			
ACC	ACC	CGC	ATC	TTC	ACC	CAA	GGC GGC
GCC	CTC	GCC	GTG	ACG	GGG	GAA	384
Thr	Thr	Arg	Ile	Phe	Thr	Gln	Gly Gly
Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Gly	Glu	
			115			120	
				125			
GCC	GTG	GTC	AAG	CTG	CCT	TAA	
							405
Ala	Val	Val	Lys	Leu	Pro		
			130				

【0103】配列番号：6

\* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：134

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

\*40

配列：

Met	Ser	Ala	Gln	Ser	Leu	Glu	Val	Gly
Gln	Lys	Ala	Arg	Leu	Ser	Lys		
1				5				
10					15			
Arg	Phe	Gly	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Ala
Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Asp		
			20				25	
				30				
Phe	Asn	Pro	Leu	His	Leu	Asp	Pro	Ala

33

34

Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Phe		
			35				40	
				45				
Glu	Arg	Pro	Ile	Val	His	Gly	Met	Leu
Leu	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Gly		
			50				55	
				60				
Leu	Leu	Gly	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Lys
Gly	Ser	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gln		
		65			70			
			75			80		
Ser	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Pro	Val	Phe
Val	Gly	Asp	Glu	Val	Thr	Ala		
				85				
			90		95			
Glu	Val	Glu	Val	Thr	Ala	Leu	Arg	Glu
Asp	Lys	Pro	Ile	Ala	Thr	Leu		
			100				105	
				110				
Thr	Thr	Arg	Ile	Phe	Thr	Gln	Gly	Gly
Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Gly	Glu		
			115			120		
				125				
Ala	Val	Val	Lys	Leu	Pro			
			130					

【0104】配列番号：7

\* 鎮の数：一本鎖

配列の長さ：27

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCSCCSTCGA TCAAYAAGTW YTAYATC

27

【0105】配列番号：8

\* 鎮の数：一本鎖

配列の長さ：27

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

SAGCCASGCC GTCCARTCSG GCCACCA

27

【0106】配列番号：9

★配列の特徴

配列の長さ：3187

特徴を表す記号：CDS

配列の型：核酸

存在位置：384..734

鎮の数：二本鎖

特徴を表す記号：CDS

トポロジー：直鎖状

40 存在位置：830..2611

配列の種類：genomic DNA

★

配列：

AGATCTGGAC CGGGGTGCTG CCCTGGGCA CGCCGGCGAG CGCCAGCCCG GACCAACCGA	60
CCAGCAGGGC GAGAGGTTC ATCCGGATTG CTTGGCAGTC TGAATGACGT CCCAGCCTAT	120
CAGCGCCCGG CGCGTCCGGC GAGGGCGCC CGGACCCAGT CGCTCACCTC TCGTCTGATC	180
CGCTCCCTC GACGGGGCGTC GCTGACAAAA AAATTCAAAC AGAAATTAAC ATTTATGTCA	240
TTTACACAA ACCCCATTTG GTTCCAGAAAT GCTCAAACGT GTGTTTGAC AGAGCAAGCA	300
ACACGTAACAC AGGGATGACA TGGAGTACCC GAAAGAACCG CGGATTCCCG CACAACAACA	360
CTGTTCTGCC GAACTGGAGA CCG ATG ATG AAT ATG GAC GTG ATC AAG AGC	410

Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser

1	5	
TTT ACC GAG CAG ATG CAA CCC TTC GCC CCC CTC ACC CCC TAC AAC		
Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn		
10	15	20
CAG CTG CTG GCC AGC AAC ATC GAA CAG CTG ACC CCG TTG CAG CTG CCC		
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala		
30	35	40
TCC GCC AAC CCC TAC CCC GAA CTG CCC CTC AAC CAG TTG CAG GCC GTG		
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val		
45	50	55
ACC AAG GTG CAG GAC ACC CAG ACC CTG CCG CCC CTG CCC ACA GTG CAA		
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln		
60	65	70
CTG GAG ACC CCC ACC CAG CTC TCC CCC CAG ATG CTG GAT GAC ATC CAG		
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln		
75	80	85
AAG CTG AGC GCC CTC CCC CAG CAG TTC AAG GAA GAG CTG GAT GTC CTG		
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu		
90	95	100
ACC GCA GAC CCC ATC AAG AAA ACC ACC CCC AAG CCC TGATAACCCC		
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys Ser Thr Gly Lys Ala		
110	115	
TGGCTCCCCG TTCCGGCACG CACATCTCCC CATGACTCGA CCCTACGGGC TAGTTCCCC		
CTCGGGTGTG CGTGAAGGAG ACCAC ATG ACC CAA CCA TCT TAT CCC CCG CTG		
Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu		
1	5	
TTC GAG CCC CTG GCC CAC TAC AAT GAC AAG CTG CTG GCC ATG GCC AAG		
Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys		
10	15	20
CCC CAG ACA GAG CCC ACC CCC CAG CCC CTG CTG CAG ACC AAT CTG GAC		
Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp		
30	35	40
CAT CTG CCC CAG GTG CTG GAG CAG CCC ACC CAG CAA CCC TGG CAG CTG		
Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu		
45	50	55
ATC CAG GCC CAG ATG AAC TGG TGG CAG GAT CAG CTC AAG CTG ATG CAG		
Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln		
60	65	70
CAC ACC CTG CTC AAA ACC GCA CCC CAG CCC ACC GAG CCC GTG ATC ACC		
His Thr Leu Leu Lys Ser Ala Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr		
75	80	85
CCG GAG CCC ACC GAT CCC CCC TTC AAG GCC CAG CCC TGG ACC GAA CAA		
Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln		
90	95	100
CCC ATC TAT GAC TAC CTC AAG CAG TCC TAC CTG CTC ACC CCC AGG CAC		
Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His		
110	115	120
CTG CTG GCC TCG GTG CAT GCC CTG GAG CCC GTC CCC CAG AAG ACC CCG		
Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg		
125	130	135

GAG	CGG	CTG	CGT	TTC	TTC	ACC	CCC	CAG	TAC	GTC	AAC	CCC	ATG	GCC	CCC	1288
Glu																
140																
145																
150																
155																
160																
165																
TCC	GAC	GGC	CAG	AAC	CTG	GTG	CGC	CTG	CCC	CTC	TTG	GCC	GAG	GAT	1384	
Ser	Asp	Gly	Gln	Asn	Leu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Asp	
170																
175																
180																
185																
CTG	GAG	GGC	ACC	CCC	GAT	CAG	CTC	AAC	ATC	CCC	CTG	ACC	GAC	GAA	TCC	1432
Leu	Glu	Arg	Ser	Ala	Asp	Gln	Leu	Asn	Ile	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Ser	
190																
195																
200																
GCC	TTC	GAG	CTC	GGG	GGG	GAT	CTG	GCC	CTG	ACC	CCC	GGC	GGG	GTG	GTG	1480
Ala	Phe	Glu	Leu	Gly	Arg	Asp	Leu	Ala	Leu	Thr	Pro	Gly	Arg	Val	Val	
205																
210																
215																
CAG	CCC	ACC	GAG	CTC	TAT	GAG	CTC	ATT	CAG	TAC	ACC	CCG	ACT	ACC	GAG	1528
Gln	Arg	Thr	Glu	Leu	Tyr	Glu	Leu	Ile	Gln	Tyr	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	
220																
225																
230																
ACG	GTG	GGC	AAG	ACA	CCT	GTG	CTG	ATA	GTG	CCG	CCC	TTC	ATC	AAC	AAG	1576
Thr	Val	Gly	Lys	Thr	Pro	Val	Ile	Val	Ile	Val	Pro	Pro	Phe	Ile	Asn	Lys
235																
240																
245																
TAC	TAC	ATC	GAC	ATG	CGG	CCC	CAG	AAC	TCC	CTG	GTC	GCC	TGG	CTG	1624	
Tyr	Tyr	Ile	Met	Asp	Met	Arg	Pro	Gln	Asn	Ser	Leu	Val	Ala	Trp	Leu	
250																
255																
260																
GTC	GCC	CAG	GGC	CAG	GCA	TTC	ATG	ATC	TCC	TGG	GCC	AAC	CCC	GGC	1672	
Val	Ala	Gln	Gly	Gln	Thr	Val	Phe	Met	Ile	Ser	Trp	Arg	Asn	Pro	Gly	
270																
275																
280																
GTG	GCC	CAG	GGC	CAA	ATC	GAT	CTC	GAC	TAC	GTG	GTG	GAT	GGC	GTC	1720	
Val	Ala	Gln	Ala	Gln	Ile	Asp	Leu	Asp	Asp	Tyr	Val	Val	Asp	Gly	Val	
285																
290																
295																
ATC	GCC	GCC	CTG	GAC	GGC	GAG	GGC	GCC	ACC	GCC	GAG	GGC	GAG	GTG	1768	
Ile	Ala	Ala	Leu	Asp	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Thr	Gly	Glu	Arg	Glu	Val	
300																
305																
310																
CAC	GCC	ATC	GCC	TAC	GGC	CCC	GGC	ACC	CCC	CTG	CTG	CTC	CCC	ATG	1816	
His	Gly	Ile	Gly	Tyr	Cys	Ile	Gly	Gly	Thr	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Met	
315																
320																
325																
GCG	TGG	CTG	GGG	GGG	CCC	CAG	AAG	CAG	CGG	GTG	GGC	ACC	GCC	ACC	1864	
Gly	Trp	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln	Lys	Gln	Arg	Val	Arg	Thr	Ala	Thr	
330																
335																
340																
CTG	TTC	ACT	ACC	CTG	GTG	GAC	TTC	TCC	CAG	CCC	GGG	GAG	CTT	GGC	ATC	1912
Leu	Phe	Thr	Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Ser	Gln	Pro	Gly	Glu	Leu	Gly	Ile	
350																
355																
360																
TTC	ATC	CAC	GAG	CCC	ATC	ATA	GGG	GGG	CTC	GAG	GGG	CAA	AAT	GAG	CCC	1960
Phe	Ile	His	Glu	Pro	Ile	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Gln	Asn	Glu	Ala	
365																
370																
375																
AAG	GCC	ATC	ATG	GAC	GGG	CCC	CAG	CTG	GGC	GTC	TCC	TTC	AGC	CTG	CTG	2008
Lys	Gly	Ile	Met	Asp	Gly	Arg	Gln	Leu	Ala	Val	Ser	Phe	Ser	Leu	Leu	
380																
385																
390																
CGG	GAG	AAC	ACC	CTC	TAC	TCG	AAC	TAC	TAC	GAC	AGC	TAC	CTC	AAC	2056	
Arg	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Ser	Tyr	Leu	Lys	

39

40

395	400	405	
CGT CAG AGC CCG GTG CCC TTC GAT CTG CTG CAC TGG AAC ACC GAC ACC			2104
Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser			
410	415	420	425
ACC AAT GTG CCG CCC AAG ACC CAC AAC ACC CTG CTG CCC CGT CTC TAC			2152
Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr			
430	435	440	
CTG GAG AAC CAG CTG GTG AAG CGG GAG CTC AAG ATC CCC AAC ACC CCC			2200
Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg			
445	450	455	
ATC GAT CTC CGC AAG GTG AAG ACC CCT GTG CTG CTG GTG TCG CGG GTG			2248
Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val			
460	465	470	
GAC GAT CAC ATC CCC CTC TCG CAG CCC ACC TGG CAG CCC ATG AAG CTG			2296
Asp Asp His Ile Ala Leu Trp Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu			
475	480	485	
TTT CCC CGG GAG CAG CCC TTC CTC CTG GCG GAG TCC GCC CAC ATC CCC			2344
Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala			
490	495	500	505
GGC ATC ATC AAC CCC CCC CCC AAC AAG TAC CCC TTC TCG CAC AAC			2392
Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn			
510	515	520	
GGG GCC GAG CCC GAG ACC CCG GAG ACC TGG CTG CCA CGG CGG ACG CAC			2440
Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His			
525	530	535	
CAG GCC CGC TCC TGG CCC GAG ATG ATG CCC TTT ATC CAG AAC CGT			2488
Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg			
540	545	550	
GAC GAA CGG TCA GAG CCC GTC CCC CGG CGG GTC CCG GAG GAA CGG CTG			2536
Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu			
555	560	565	
CCC CCC CCC CCC CAC TAT GTC AAG GTG CGG CTC AAC CCC GTG TTT			2584
Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe			
570	575	580	585
CCC TCC CCA ACA GAG GAG GAC GCC CCA TGAGCCACA ATCCCTGGAA			2631
Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp Ala Ala			
590			
GTAGGCCAGA AGCCCCGTCT CAGCAAGCCG TTCCGGGGCGG CGGAGGTAGC CCCCTTCGCC			2691
CCCGCTCTCGG AGGACTTCAA CCCCCCTGCCAC CTGGACCCCGG CCTTCGGGGCC CACCAAGGGG			2751
TTGGACCCGG CCATAGTCCA CGGCATGCTG CTGGCCACCC TCTTCCTCCGG CCTGCTGGGC			2811
CACCAAGTTCG CGGCCAAGGG GACCATCTAT CTGGTCAAAC CGCTCACCTT CAAGCTCCGG			2871
GTCTTTGTCG CGGACGGAGT GACCCCGCGAG GTGGAGGTGA CGGCCCTTCG CGAGGACAAG			2931
CCCATGCCCA CCTGACCCAC CGGCATCTTC ACCCAAGGGG GGGCCCTCCC CGTGACCCGG			2991
GAAGCCCTGG TCAACCTGCC TTAACCAACCG GCGGCCACCCA CGCACAAATCA CCCCCCCCCC			3051
TGCCCCGGCTG ATTGTTCTCC CCCCCCTCCC TTGCCCCCTT TTTCGGGGCA ATTGGCCCA			3111
CCCCCTTCCC CTGCCCCGCC TAACTGCCCTA AAATGGCCCC CCTGCCGTGT AGGCATTCA			3171
CCAGCTAGAG GAATTTC			3187

【0107】配列番号：10

鎖の数：二本鎖

配列の長さ：3187

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

50 配列の種類：genomic DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

\* 存在位置: 2611..3012

\*

配列:

AGATCTGGAC CGGGGTGCTG CCCTGGGCA CGCCGGGAG GCGCAGCGG GAGCAACCGA 60  
 CGAGCAGGGC GAGAGTTTC ATCGGATTTC CTTGGCAGTC TGAATGACGT GCGAGCTAT 120  
 CAGCGGGCG CGCGTGGCGC GAGGGCGGCC CGGACCCAGT CGGTACCTC TCGTCTGATC 180  
 CGCTCCCTC GACGGCGTC GCTGACAAAA AAATTCAAAC AGAAATTAAAC ATTTATGTCA 240  
 TTTACACAA ACCCATTTG GTTCCAGAACT CCTCAAACGT GTGTTTGAC AGAGCAAGCA 300  
 ACACGTAAC AGGGATGACA TCGAGTACCC GTAAGAAGGG CGGATTCGCC CACAACAACA 360  
 CTGTTCTGCC GAACTGGAGA CGCATGATCA ATATGACGT GATCAACAGC TTTACCGAGC 420  
 AGATGCAAGG CTTCGGCGCC CCCCTCACCC GCTACAACCA GCTGCTGCC AGCAACATCG 480  
 AACAGCTGAC CGGGTGCAG CTGGCTCGG CCAAGCCTA CGCGAAGCTG CGCTCAACC 540  
 AGTTGAGGC CGTGACCAAG GTGCGAGACA CCCAGAGCT GCGGGCCCTG CGCACAGTGC 600  
 AACTGGAGAC CGCCAGCCAG CTCTCCCCC AGATGCTGGA TGACATCCAG AACGCTGAGCG 660  
 CCCTGGCCA GCAAGTCAGA GAAGAGCTGG ATGTCCTGAC CGAGAGCGC ATCAAGAAAA 720  
 GCACGGCAA GGCCTGATAA CCCCTGGCTG CCCGGTCCGG CAGCCACATC TCCCCATGAC 780  
 TCGACCTAC GGGCTAGTTG CGGCTCGGG TGTGGTGAA GGAGAGCACA TGAGCCAACC 840  
 ATCTTATGCC CGCGTGTTCG AGGCCCTGCC CCACTACAAT GACAAGTGC TGGCCATGGC 900  
 CAAGGGCCAG ACAGAGGCCA CGGCCAGCC GCTGCTGCCAG ACCAATCTGG ACGATCTGG 960  
 CGAGGTCTG GAGCAGGGCA CGCACCAACC CTGGCAGTG ATCCAGCCCC AGATGAACTG 1020  
 GTGGCAGGAT CAGCTCAAGC TGATGCCAGCA CACCCCTGTC AAAAGGCCAG CGCAGCCAG 1080  
 CGAGCCGGTG ATCACCCCG AGGCCAGCGA TCGGGCTTC AAGGCGGAGG CCTGGAGCGA 1140  
 ACAACCCATC TATGACTACC TCAAGCAGTC CTACCTGTC ACCGCCAGGC ACCTGCTGGC 1200  
 CTGGTGGAT GCGCTGGAGG GCGTCCCCCA AAAGAGCCCG GAGGGCTGC GTTCTTCAC 1260  
 CCGCCAGTAC GTCAACGCCA TGCCCCCAG CAACTTCTG GCAACCAACCC CGAGCTGCT 1320  
 CAAGCTGACC CTGGAGTCG AGGCCAGAA CCTGGTGGCC GGAAGGCCCG TCTGGCCGA 1380  
 GGATCTGGAG CGCACCGCCG ATCAGCTAA CATCCGCTG ACCGACAACT CGGCTTCTGA 1440  
 CCTGGGGCGG GATCTGGCC TGACCCCCGG CGGGTGGTG CAGGGCACCG AGCTCTATGA 1500  
 OCTCATTCAG TACACCCCGA CTACCGAGAC GGTGGCGAAG ACACCTGTC TGATAGTGCC 1560  
 CGCCCTCATC AACAAAGTACT ACATCATGGA CATGGGGCC CAGAACTCCC TGGCCCTG 1620  
 CCTGGTCCC CAGGCCAGA CGGTATTCTG GATCTCTGG CGCAACCCCC CGTGCCCCA 1680  
 CGCCCAAATC GATCTCGACG ACTACGTGGT GGATGGCGTC ATCGCCCCCC TGGACGGCGT 1740  
 CGAGGGGGCC ACCGGCGAGC CGGAGGTGCA CGGCATCGGC TACTGCATCG CGGGCACCCG 1800  
 CCTGTCCTC GCGATGGCT GCGTGGCGC CGGGGCCAG AAGCAGCGG TGGCCACCCG 1860  
 CACCCCTGTC ACTACCTCTG TGGAATTCTC CGAGCCCCGG GAGCTTGGCA TCTTCATCCA 1920  
 CGAGCCCCATC ATAGCGGCC TCGAGGGCCA AAATGAGCCC AAGGGCATCA TGGACGGCG 1980  
 CCAGCTGGCG GTCTCTTCA GCGTGTGCG CGAGAACAGC CTCTACTGGA ACTACTACAT 2040  
 CGACAGCTAC CTCAAGGGTC AGACCCGGT GCGCTTCTG CTGCTGACT CGAACAGCGA 2100  
 CACCAACAT GTGGGGGCC AGACCCCAA CACCCCTGTC CGGGCTCT ACCTGGAGAA 2160  
 CCAGCTGGTG AAGGGGGAGC TCAAGATCTG CAACACCCCG ATCGATCTG CGAAGGTGAA 2220  
 GACCCCTGTC CTGGTGGTGT CGGGGGTGGA CGATCACATC CGCCCTGTC AGGGCACCTG 2280  
 CGAGGGCATG AACCTGTTG CGGGGGAGCA CGCCCTCTC CTGGGGACT CGGGCCACAT 2340  
 CGCCGGCATC ATCAACCCCG CGGGGCCAA CAAGTACGGC TTCTGGCACA ACGGGGCCGA 2400  
 CGCCGAGAGC CGGGAGACCT GCGTGGCAGG CGGGACCCAC CAGGGCCGCT CCTGGTGGCC 2460  
 CGAGATGATG CGTTTATCC AGAACCGTGA CGAAGGGTCA GAGGGCGTCC CGGGGGGGT 2520  
 CGGGGAGGAA CGGCTGGCCC CGGGCCCCCG CCACTATGTC AAGGTGGCCG TCAACCCCGT 2580  
 GTTTCCTGCA CCAACAGAGG AGGACCCCCC ATG AGC GCA CAA TCC CTG GAA GTA 2634

Met Ser Ala Glu Ser Leu Glu Val

43

44

Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys Arg Phe Gly Ala Ala Glu Val Ala  
 10 15 20  
 CCC TTC GCC CCG CTC TCG GAG GAC TTC AAC CCC CTG CAC CTG GAC CCG 2730  
 Ala Phe Ala Ala Leu Ser Glu Asp Phe Asn Pro Leu His Leu Asp Pro  
 25 30 35 40  
 CCC TTC GCC CCC ACC ACG CCG TTC GAG CGG CCC ATA GTC CAC GGC ATG 2778  
 Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Phe Glu Arg Pro Ile Val His Gly Met  
 45 50 55  
 CTG CTC GCC AGC CTC TTC TCC GGG CTG CTG CGC CAG CAG TTG CCG GGC 2826  
 Leu Leu Ala Ser Leu Phe Ser Gly Leu Leu Gly Gln Gln Leu Pro Gly  
 60 65 70  
 AAG GGG AGC ATC TAT CTG GGT CAA AGC CTC AGC TTC AAG CTG CCG GTC 2874  
 Lys Gly Ser Ile Tyr Leu Gly Gln Ser Leu Ser Phe Lys Leu Pro Val  
 75 80 85  
 TTT GTC GGG GAC GAG GTG ACG GCC CAG GTG CAG GTG ACC GCC CTT CCC 2922  
 Phe Val Gly Asp Glu Val Thr Ala Glu Val Glu Val Thr Ala Leu Arg  
 90 95 100  
 GAG GAC AAG CCC ATC CCC ACC CTG ACC ACC CGC ATC TTC ACC CAA GGC 2970  
 Glu Asp Lys Pro Ile Ala Thr Leu Thr Thr Arg Ile Phe Thr Gln Gly  
 105 110 115 120  
 CGC GCC CTC GCC GTG ACG GCG GAA GCC GTG GTC AAG CTG CCT 3012  
 Gly Ala Leu Ala Val Thr Gly Glu Ala Val Val Lys Leu Pro  
 125 130  
 TAAGCACCGG CGGCACGGAG GCACAATCAG CCCGGCCCT GCGGGGCTGA TTGTTCTCCC 3072  
 CGCCCTCCGCT TCCCCCTTT TTCCGGGCAA TTGGGCCAG GCGCTTTCCC TGCCCCGCT 3132  
 AACTGCCCTAA AATGGCCGCC CTGGCGTGTGTA GGCATTTCATC CAGCTAGAGG AATTC 3187

【0108】配列番号：11

\* 鎮の数：一本鎮

配列の長さ：25

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AGTTCCCCCC TCGGGTGTGG GTGAA

25

【0109】配列番号：12

\* 鎮の数：一本鎮

配列の長さ：25

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCCATATCGG CTCATGGGGC GTCCT

25

【0110】配列番号：13

★ 鎮の数：一本鎮

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCCATATGAG CCCACAATCC CTGCAAGTAG

30

【0111】配列番号：14

★ 鎮の数：一本鎮

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTGGGATCCG CCCGTGCTTA AGCCAGCTTG

30

【0112】配列番号：15

◆ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：20

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

◆

配列：

Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Phe Gly Ala Ala  
 20

【0113】配列番号：16

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

配列：

Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Arg Phe Gly Ala Ala  
 20

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

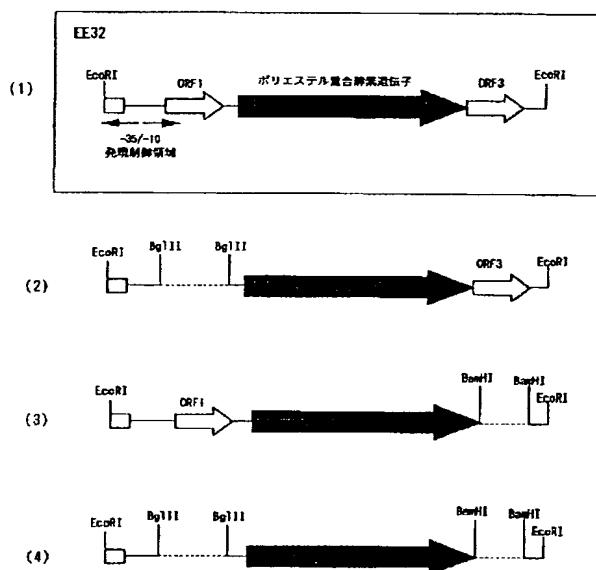
\*

【図面の簡単な説明】

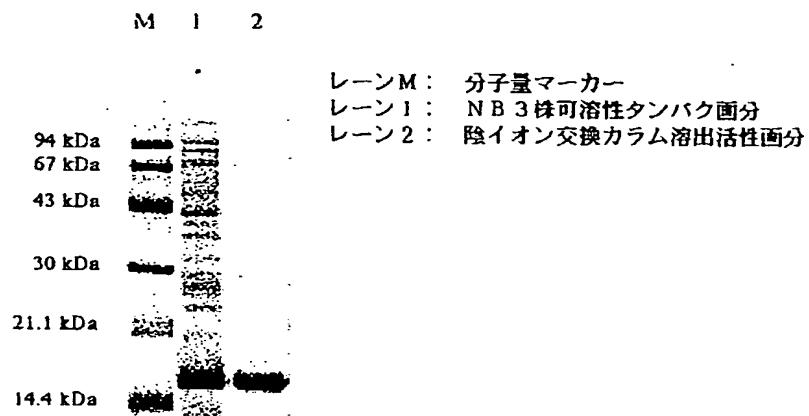
【図1】本発明の遺伝子の構築図である。

\* 【図2】 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真である。

【図1】



【図2】




---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.*	識別記号	F I
//(C 1 2 N 1/21		
C 1 2 R 1:05)		
(C 1 2 N 9/88		
C 1 2 R 1:05)		
(C 1 2 P 7/62		
C 1 2 R 1:05)		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**